
Herstellung eines von Willbrand Faktor-Präparates mit hoher spezifischer Aktivität

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines von Willbrand Faktor-Präparates mit gesteigerter spezifischer VWF-Aktivität, wobei Hydroxylapatit als Chromatographie-Medium verwendet wird.

Der von Willebrand Faktor ist ein Glykoprotein, das in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird. Das Molekulargewicht des Monomers beträgt ca. 225 000 Da. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken werden in der Zelle Dimere ausgebildet, die wiederum zu Oligomeren aus bis zu 40 dimeren Untereinheiten ebenfalls über Disulfidverknüpfungen assoziieren. Die Konzentration des in das Plasma abgegebenen von Willebrand Faktors (VWF) beträgt 5 – 10 mg/l.

In der primären Hämostase hat der VWF die Aufgabe, die Adhäsion von Thrombozyten an verletztes Subendothel zu vermitteln und unter Bedingungen hoher Scherkräfte, wie im arteriellen System, die Thrombozytenaggregation zu unterstützen. Als Funktion in der sekundären Hämostase bindet VWF Faktor VIII, einen wichtigen Cofaktor bei der Blutgerinnung, in einem nicht kovalenten Komplex. Faktor VIII wird dadurch stabilisiert und vor vorzeitigem Abbau geschützt.

Das von Willebrand Syndrom (VWS) ist eine Bluterkrankheit, die durch quantitative oder qualitative Veränderung des VWF hervorgerufen wird. Häufig werden für die Behandlung von schweren Formen des VWS plasmatische Faktor VIII-Präparate eingesetzt, die einen relativ hohen Anteil an VWF enthalten. Blutungen können damit zwar gestillt werden, gleichzeitig steigt aber, besonders bei häufiger oder längerer Anwendung, das Thromboserisiko. Dies ist auf eine Überdosierung von Faktor VIII zurückzuführen. Wesentlich günstiger im Sinne der Patientensicherheit ist die Therapie von VWS-Kranken mit hochreinen, Faktor VIII-armen / -freien VWF-Konzentraten.

Häufiges Problem bei der Herstellung eines VWF-Präparates ist der Verlust an spezifischer VWF-Aktivität. Gemäß der o.g. Definition beträgt bei einer VWF-Konzentration von 5 – 10 µg/ml im Blut und einer definierten Aktivität von durchschnittlich 1 E/ml die spezifische VWF-Aktivität 100 – 200 E pro mg VWF-Antigen. In der Regel sinkt die spezifische VWF-Aktivität während der ersten Aufarbeitungsschritte bei der Herstellung von VWF-Präparaten drastisch. Strukturell korreliert dieser Verlust an spezifischer Aktivität mit proteolytischen Abbaureaktionen, die zur Erniedrigung des Anteils an hochmolekularen VWF-Molekülen (Multimeren) und zur Erhöhung des Anteils an niedermolekularen VWF-Molekülen (Dimeren / Tetrameren) führen. Für ein therapeutisches Präparat ist es erstrebenswert, die während der Aufarbeitung von Plasmafraktionen entstehenden weniger aktiven niedermolekularen VWF-Oligomere zu entfernen. VWF-Lösungen mit einer niedrigen spezifischen VWF-Aktivität enthalten einen höheren Anteil an weniger erwünschten niedermolekularen VWF-Oligomeren, als VWF-Lösungen mit einer hohen spezifischen VWF-Aktivität. Wünschenswert wäre ein Verfahren, mit dem therapeutisch wirksame Präparate mit einer spezifischen Aktivität von > 100 E pro mg VWF-Antigen aus einer Quelle mit einer spezifischen Aktivität von < 100 E pro mg VWF-Antigen hergestellt werden kann.

In der Literatur werden verschiedene Verfahren beschrieben, die auf eine Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität zielen:

WO 98/38219 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von VWF, bei dem VWF bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch fraktionierte Elution VWF mit hoher spezifischer Aktivität gewonnen wird.

Die WO 96/10584 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem rekombinanten VWF mittels kombinierter Anionenaustausch-/Heparin-Affinitätschromatographie und die EP 0 705 846 die Trennung von hoch- und niedermolekularen Fraktionen von rekombinantem VWF mittels Heparin-Affinitätschromatographie.

Die bisher beschriebenen Verfahren sind mit Nachteilen hinsichtlich Wirtschaftlichkeit und Reinigungseffektivität behaftet. Bei der Verwendung einer Heparin-Affinitätschromatographie zur Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität wurde beispielsweise die Aktivität einer vorgereinigten Proteinlösung, die rekombinanten VWF enthält, von 4,3 E pro mg VWF-Antigen auf 7,3 E/mg erhöht. Die finale spezifische VWF-Aktivität des rekombinanten Proteins ist niedrig. Die Kosten für eine Affinitätschromatographie sind

vergleichsweise hoch. Bessere Ergebnisse wurden durch Anwendung einer Kationenaustauschchromatographie erzielt. Bei einer Reinigung mittels eines rekombinanten Antikörpers wurde in Kombination mit vorgeschalteter Anionenaustausch- und Immunaффinitätschromatographie eine spezifische VWF-Aktivität von 30,4 E/mg erzielt. Am Beispiel der Reinigung eines plasmatischen VWF durch die Kombination Anionenaustausch- und Kationenaustauschchromatographie wurde eine erzielte Reinheit von 65 E pro mg Protein erreicht. Auf die Steigerung der spezifischen VWF-Aktivität (Aktivität pro VWF- Antigenmenge) wurde nicht eingegangen.

Es besteht ein Bedürfnis nach einem wirtschaftlichen Verfahren, mit dem wenig aktive VWF-Moleküle aus einer Proteinfraction abgereichert werden können, um so die spezifische Aktivität zu erhöhen. Dabei soll eine spezifische VWF-Aktivität erreicht werden, die der im Plasma gesunder Menschen entspricht. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch einen chromatographischen Separationsschritt unter Verwendung von Hydroxylapatit gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung von VWF mit hoher spezifischer Aktivität von VWF mit niedriger spezifischer Aktivität, umfassend eine Chromatographie mit Hydroxylapatit als Chromatographie-Matrix. Als hohe spezifische VWF-Aktivität wird beispielsweise ein Wert von >120 E pro mg VWF-Antigen und als niedrige spezifische VWF-Aktivität beispielsweise ein Wert von < 70 E pro mg VWF-Antigen bezeichnet. Abhängig von der Qualität des Ausgangsmateriales können hochaktive bzw. niedrigaktive Fraktionen anders definiert werden. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung mit hoher spezifischer VWF-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, dass man eine VWF enthaltende Zusammensetzung durch Hydroxylapatit-Chromatographie aufreinigt. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer VWF enthaltenden Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass man die VWF enthaltende Zusammensetzung einer Hydroxylapatit-Chromatographie unterwirft.

Hydroxylapatit ist eine Form von Calciumphosphat mit der Zusammensetzung $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ bzw. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, die als stationäre Phase für die Chromatographie von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Makromolekülen eingesetzt werden kann. Neben der kristallinen Form von Hydroxylapatit kann auch eine keramische Form verwendet werden, welche durch Sintern erhältlich ist. Hydroxylapatit kann beispielsweise von der Firma Bio-

Rad (München, Deutschland) bezogen werden. Deren keramisches Hydroxylapatit wird in zwei Formen (Typ 1 und Typ 2) zur Verfügung gestellt. Typ 1-Material hat aufgrund größerer Oberflächen eine höhere Bindungskapazität für kleinere Moleküle, z.B. kleine Proteine. Dagegen weist das Typ 2-Material größere Poren in den Partikeln auf, die ein Eindringen und damit eine bessere Bindung von großen Molekülen, z.B. DNA oder großen Proteinen, ermöglicht. Die Materialien weisen vorzugsweise folgende Eigenschaften auf:

Tabelle 1

	Dynamische Bindungskapazität	Nominale Porendurchmesser
Typ 1	>13,7 mg Lysozym/ml CHT*	600-800 Å
Typ 2	>6,8 mg Lysozym/ml CHT*	800-1000 Å

*CHT=Ceramic Hydroxy Apatite

Kristallines oder keramisches Hydroxylapatit ist frei verfügbar. Verfahren zu ihrer Herstellung sind im Stand der Technik bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von keramischem Hydroxylapatit bevorzugt.

Hydroxylapatit, insbesondere in seiner keramikstabilisierten Form ist außerordentlich gut geeignet, um Prozesse im Industriemaßstab durchzuführen. Aufgrund seiner Trenneigenschaften bietet Hydroxylapatit eine bessere Auflösung als die vielfach beschriebenen Ionenaustauschchromatographiemedien. Bei dem Hydroxylapatit-Reinigungsverfahren müssen den Puffern weder Calcium noch Aminosäuren zugesetzt werden.

Das Verfahren kann in Form einer Säulenchromatographie oder im Batch-Verfahren durchgeführt werden; die Durchführung einer Säulenchromatographie ist bevorzugt.

Üblicherweise umfasst das Verfahren, dass

- (a) VWF an die Hydroxylapatit-Matrix gebunden wird,
- (b) VWF mit niedriger spezifischer VWF-Aktivität bei mittlerer Salzkonzentration herausgewaschen wird; und
- (c) anschließend VWF mit hoher spezifischer VWF-Aktivität bei höherer Salzkonzentration eluiert wird.

In Schritt (a) wird eine Lösung, die VWF hoher und niedriger spezifischer VWF-Aktivität enthält, mit der Hydroxylapatit-Matrix in Kontakt gebracht. Die Gesamtkonzentration an Natrium- und/oder Kaliumphosphat in dieser Lösung ist üblicherweise 0 bis 200 mM, vorzugsweise 1 bis 100 mM, bevorzugter 1 bis 50 mM, am bevorzugtesten 10 bis 30 mM.

In dem Waschschrift (b) wird die Hydroxylapatit-Matrix mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration gewaschen. Die Gesamtkonzentration an Natrium- und/oder Kaliumphosphat in diesem Waschpuffer ist in der Regel 100 bis 300 mM, vorzugsweise 200 bis 300 mM, bevorzugter 200 bis 270 mM, am bevorzugtesten 210 bis 250 mM. Dabei wird VWF mit niedriger spezifischer VWF-Aktivität herausgewaschen. Je höher der pH-Wert des Puffers, desto niedriger kann die Salzkonzentration gewählt werden.

In Schritt (c) kann VWF hoher spezifischer VWF-Aktivität mit einem Puffer höherer Salzkonzentration eluiert werden. Der Elutionspuffer enthält in der Regel 200 bis 500 mM, vorzugsweise 250 bis 500 mM, bevorzugter 300 bis 400 mM Natrium- und/oder Kaliumphosphat.

Durch Verschiebung der Salzkonzentrationen können Ausbeute und Reinheit verändert werden. Je höher die Salzkonzentration im Waschpuffer ist, desto aktiver ist die erhaltene Wertfraktion. Die Ausbeute erniedrigt sich dadurch allerdings. Weiterhin beeinflusst der gewählte pH-Wert die optimale Salzkonzentration für den Waschpuffer. Je niedriger der pH-Wert ist, desto stärker ist die Bindung von VWF an die Hydroxylapatit-Matrix. Entsprechend können die gewählten Salzkonzentrationen bei niedrigen pH-Werten höher sein, bei höheren pH-Werten hingegen niedriger.

Die Hydroxylapatit-Chromatographie wird bei einem pH-Wert von 5 bis 7, vorzugsweise von 5,5 bis 6,8, bevorzugter von 6,0 bis 6,8, am bevorzugtesten von 6,2 bis 6,5 durchgeführt. Üblicherweise haben Lauf-, Wasch- und Elutionspuffer, sowie die aufzutragende Proteinlösung den gleichen pH-Wert. Es sind aber auch Varianten praktikabel, bei denen diese Lösungen unterschiedliche pH-Werte aufweisen.

Je nach pH-Wert-Bedingungen und Ausbeute-Bestrebungen können wenig aktive VWF-Moleküle von Hydroxylapatit-Säulen mit Puffern eluiert werden, die eine mittlere Salzkonzentration enthalten. Bei pH 6,0 können beispielsweise Puffer verwendet werden, die 200 bis 270 mM Natrium- oder Kaliumphosphat, bevorzugt 220 bis 250 mM

Natriumphosphat enthalten. Bei pH 6,5 wären beispielsweise Puffer geeignet, die 180 bis 260 mM, bevorzugt 210 bis 250 mM Natrium- oder Kaliumphosphat enthalten. Nach der Abtrennung der wenig aktiven VWF-Moleküle können die hochaktiven VWF-Moleküle mit einem Hochsalzpuffer, beispielsweise 250 bis 500 mM Natrium- oder Kaliumphosphat, bevorzugt 300 bis 400 mM Natrium- oder Kaliumphosphat eluiert werden.

Die erfindungsgemäße bindende Hydroxylapatit-Chromatographie kann mit anderen Reinigungstechniken kombiniert werden. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, zunächst eine "Durchlaufchromatographie" mit Hydroxylapatit zur Abreicherung der Hauptverunreinigungen durchzuführen. Anschließend wird die Durchlaufraktion auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen, wie oben beschrieben. VWF-Moleküle werden gebunden und VWF hoher spezifischer VWF-Aktivität wird selektiv eluiert.

In einer besonderen Ausführungsform wird daher zunächst eine Durchlaufchromatographie mit Hydroxylapatit durchgeführt, wobei VWF nicht an die Hydroxylapatit-Matrix bindet, und anschließend die Durchlaufraktion unter bindenden Bedingungen rechromatographiert und die VWF-Fraktion mit VWF hoher spezifischer VWF-Aktivität eluiert.

Eine "Durchlaufchromatographie" im Sinne dieser Anmeldung umfasst, dass (i) eine Zusammensetzung, die VWF und ein oder mehrere verunreinigende Proteine enthält, mit einer Hydroxylapatit-Matrix in Kontakt gebracht wird, so dass wenigstens ein verunreinigendes Protein an die Hydroxylapatit-Matrix gebunden wird, während VWF im wesentlichen nicht an die Hydroxylapatit-Matrix gebunden wird, und gegebenenfalls anschließend (ii) ungebundenes VWF von der Hydroxylapatit-Matrix getrennt wird. Im Fall einer Säulenchromatographie befindet sich VWF im Durchlauf und wenigstens ein verunreinigendes Protein, z. B. Fibronectin und/oder Fibrinogen, wird an das Hydroxylapatit gebunden.

Die Durchlaufchromatographie wird bei einem pH-Wert von 6,5 bis 8,5, vorzugsweise von 6,8 bis 8,5, bevorzugter von 6,8 bis 7,5, am bevorzugtesten von 7,0 bis 7,5 durchgeführt. Üblicherweise haben Lauf-, Wasch- und Elutionspuffer, sowie die aufzutragende Proteinlösung den gleichen pH-Wert. Es sind aber auch Varianten praktikabel, bei denen diese Lösungen unterschiedlichen pH-Werte aufweisen.

Die VWF enthaltende Zusammensetzung, die bei der Durchlaufchromatographie mit der Hydroxylapatitmatrix in Kontakt gebracht wird, enthält vorzugsweise Natriumphosphat und/oder Kaliumphosphat. Die Gesamtkonzentration an Natriumphosphat und/oder Kaliumphosphat in der Lösung ist beispielsweise 0 bis 100 mM, vorzugsweise 10 bis 50 mM, am bevorzugtesten 20 bis 40 mM, d. h. als Laufpuffer kann eine Pufferlösung mit den genannten Konzentrationen eingesetzt werden.

Durch den vorgeschalteten Schritt der Durchlaufchromatographie können VWF-Präparationen erhalten werden, die nur geringe Mengen an Fibrinogen und Fibronectin enthalten. In der Regel ist die Konzentration an Fibrinogen-Antigen in der Durchlauffraktion niedriger als 25 µg/ml, bevorzugt niedriger als 15 µg/ml, bevorzugter niedriger als 10 µg/ml, am bevorzugtesten höchstens 5 µg/ml. Die Konzentration an Fibronectin-Antigen in der Durchlauffraktion ist üblicherweise niedriger als 250 µg/ml, bevorzugt niedriger als 150 µg/ml, bevorzugter niedriger als 100 µg/ml, am bevorzugtesten höchstens 50 µg/ml. Die Konzentration an Fibrinogen-Antigen und Fibronectin-Antigen kann durch an sich bekannte Verfahren bestimmt werden.

Durch den vorgeschalteten Schritt der Durchlaufchromatographie kann eine erhebliche Abreicherung der verunreinigenden Proteine Fibrinogen und Fibronectin erzielt werden. So ist die Konzentration an Fibrinogen in der Durchlauffraktion vorzugsweise niedriger als 10%, bevorzugter niedriger als 5%, noch bevorzugter niedriger als 2,5% der Konzentration an Fibrinogen in der Auftragslösung (vor Durchlaufchromatographie). Die Konzentration an Fibronectin in der Durchlauffraktion ist vorzugsweise niedriger als 10%, bevorzugter niedriger als 5%, noch bevorzugter niedriger als 2,5% der Konzentration an Fibronectin in der Auftragslösung (vor Durchlaufchromatographie).

Die Ausbeute der Durchlaufchromatographie (bezogen auf die Massenbilanz) ist in der Regel höher als 50%, bevorzugt höher als 60%, am bevorzugtesten höher als 75%. Für die Durchlaufchromatographie ist es sinnvoll, aber nicht notwendig, Phosphationen als Puffersubstanz zu verwenden. Für die Elution von VWF bei der bindenden Chromatographie ist Phosphat ein spezifisches Agens.

Als Ausgangsmaterialien können allgemein VWF-haltige Lösungen, im Besonderen VWF-haltige Plasmafraktionen eingesetzt werden. VWF kann bei pH-Werten von vorzugsweise 6,0 bis 6,8, besonders bevorzugt 6,2 bis 6,5, bei einer niedrigen Salzkonzentration von 0 –

100 mM Kalium- oder Natriumphosphat, bevorzugt bei 10 – 50 mM an eine Hydroxylapatit-Säule gebunden werden.

In einer besonderen Ausführungsform kann anstelle von reinem Hydroxylapatit als Chromatographiematrix Fluoroapatit verwendet werden. Fluoroapatit wird durch Umsetzung von Hydroxylapatit mit einer fluoridhaltigen Substanz hergestellt. Die Firma Bio-Rad (München, Deutschland) erzeugt z.B. keramisches Fluoroapatit durch eine 90%-ige Umsetzung von keramischem Hydroxylapatit mit einem Fluorinreagenz. Fluoroapatit ist im Vergleich zu Hydroxylapatit unter sauren pH-Wertbedingungen deutlich stabiler. Deshalb wird Fluoroapatit üblicherweise eingesetzt, um Chromatographien bei niedrigerem pH durchzuführen, als für Hydroxylapatit technisch sinnvoll. Für eine Aufreinigung von hochaktiven VWF-Molekülen mit Fluoroapatit kann die Chromatographie ähnlich zu dem für Hydroxylapatit vorgeschlagenen Verfahren durchgeführt werden. Salzkonzentrationen müssen dem gewählten pH-Wert ($\geq 5,0$) angepasst werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiterhin einen oder mehrere der folgenden Schritte umfassen:

- (1) Schockgefrieren bei einer Temperatur von unter -30°C und Auftauen nahe 0°C (Kryopräzipitation)
- (2) Ethanolfällung oder Adsorption an Aluminiumhydroxid
- (3) Virusinaktivierung der VWF enthaltenden Zusammensetzung durch Solvens/Detergens-Behandlung
- (4) Anionenaustauschchromatographie
- (5) Fällung von Fibronektin durch Einstellung eines pH-Werts von unter pH 5,4
- (6) Affinitätschromatographie
- (7) Diafiltration oder Ultrafiltration
- (8) Umpuffern durch Dialyse oder Gelfiltration
- (9) Sterilfiltration
- (10) Lyophilisierung
- (11) Virusinaktivierung durch Hitzebehandlung (z.B. ca. 30 min bei ca. 100°C)

Die Verfahrensschritte (1) bis (5) werden vorzugsweise vor der Hydroxylapatit-Chromatographie durchgeführt. Es können aber auch weniger als die 5 Verfahrensschritte durchgeführt werden. Die Reihenfolge der Schritte ist nicht zwingend.

Die Schritte (6) bis (11) können durchgeführt werden, falls gewünscht. Insbesondere die Affinitätschromatographie ist aber nicht notwendig, da bereits durch die Hydroxylapatitchromatographie eine hohe Reinheit erreicht werden kann.

Als Ausgangsmaterial für die Verfahren der vorliegenden Erfindung kann somit eine vorgereinigte Plasmafraktion verwendet werden. Hierbei kann es sich um eine weiter aufgereinigte Kryopräzipitat-Lösung handeln. Die Kryopräzipitat-Lösung kann beispielsweise mit Aluminiumhydroxid gefällt werden und/oder chromatographisch weiter aufgereinigt werden. So kann die Kryopräzipitat-Lösung z. B. mit Aluminiumhydroxid gefällt werden und anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt werden. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die Kryopräzipitat-Lösung einer Virusinaktivierung unterworfen wird. Bevorzugtes Verfahren zur Virusinaktivierung ist eine Solvens/Detergens-Behandlung, wie sie im US-Patent Nr. 4,540,573 beschrieben ist.

Als Ausgangsmaterial kann ebenso eine Proteinlösung enthaltend rekombinanten VWF (rVWF) aus Zellkulturüberständen verwendet werden. Der Ausdruck "rVWF" umfasst sowohl VWF mit der Wildtypsequenz als auch Varianten mit einer gegenüber Wildtyp-VWF veränderten Aminosäuresequenz, wobei ein oder mehrere Aminosäuren substituiert, deletiert und/oder hinzugefügt sein können. Die Varianten weisen in der Regel VWF-Aktivität auf. Verfahren zur Herstellung geeigneter Expressionsvektoren, zur Einschleusung der Vektoren in die Wirtszellen und zur Kultivierung der Wirtszellen sind dem Fachmann an sich bekannt (Fischer et al. Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero and homo-dimers. FEBS Lett 1994; 351:345-348. Fischer et al. Structural analysis of recombinant von Willebrand factor produced at industrial scale fermentation of transformed CHO cells co-expressing recombinant furin. FEBS Lett 1995; 375:259-262).

Insbesondere bei Verwendung von Plasmafraktionen kann vor der Hydroxylapatit-Chromatographie eine pH-Fällung zur Abtrennung von Fibronektin durchgeführt werden. Die pH-Fällung zur Abtrennung von Fibronektin aus einer Plasmafraktion umfasst beispielsweise, dass man

- (i) den pH-Wert der Plasmafraktion auf unter pH 5,4 einstellt, so dass sich ein Niederschlag bildet und
- (ii) den gebildeten Niederschlag abtrennt.

Der Ausdruck "Plasmafraktion" bezeichnet in diesem Zusammenhang eine Zusammensetzung, die aus Plasma erhalten wurde und verschiedene Plasmaproteine enthält. Die Plasmafraktion, die als Ausgangszusammensetzung in Schritt (i) eingesetzt wird, ist eine flüssige Zusammensetzung. Vorzugsweise ist die flüssige Zusammensetzung eine Lösung oder eine Suspension, am bevorzugtesten ist die Zusammensetzung eine Lösung. In einer besonderen Ausführungsform ist die Plasmafraktion gelöstes Kryopräzipitat. Dieses gelöste Kryopräzipitat kann durch verschiedene Verfahren vorgereinigt sein. Beispiele sind Aluminiumhydroxid-Behandlung, Solvens-/Detergens-Behandlung und/oder Anionenaustauschchromatographie. Die Konzentration an Natriumchlorid oder Kaliumchlorid in der Plasmafraktion ist vorzugsweise 50 bis 250 mM, bevorzugter 100 bis 200 mM, am bevorzugtesten 120 bis 150 mM. Die Plasmafraktion kann beispielsweise folgende Puffersubstanzen enthalten: Citrationen, Acetationen, Phosphationen und/oder Aminosäuren.

Die Konzentration an Fibronektin in der Plasmafraktion, die Schritt (i) unterworfen wird, ist in der Regel mindestens 0,05 g/l, vorzugsweise wenigstens 0,1 g/l, noch bevorzugter wenigstens 0,25 g/l, am bevorzugtesten wenigstens 0,5 g/l. Die Konzentration an Fibronektin in der Plasmafraktion kann beispielsweise 0,1 bis 5 g/l, vorzugsweise 0,1 bis 2 g/l sein.

Zur Abtrennung von Fibronektin aus der Plasmafraktion wird der pH-Wert der Plasmafraktion auf unter pH 5,4 eingestellt. Dabei bildet sich ein Niederschlag, der Fibronektin enthält. Vorzugsweise wird der pH-Wert auf unter pH 5,3 eingestellt, noch bevorzugter auf unter pH 5,2. Der eingestellte pH-Wert liegt somit vorzugsweise in einem Bereich von pH 4,5 bis unter 5,4, bevorzugt in einem Bereich von pH 4,7 bis 5,3, bevorzugter in einem Bereich von pH 4,8 bis 5,2, noch bevorzugter in einem Bereich von pH 4,9 bis 5,1. In der Regel wird das Einstellen des pH-Werts durch Zugabe einer sauren Komponente erreicht. Als saure Komponente können verschiedene Säuren eingesetzt werden, beispielsweise Salzsäure, Phosphorsäure oder Essigsäure. Die saure Komponente wird üblicherweise über einen bestimmten Zeitraum zugegeben, beispielsweise tropfenweise. Somit wird nach und nach ein pH-Wert im oben näher definierten Bereich eingestellt ("titriert").

Während und nach dem Einstellen des pH-Werts wird die Plasmafraktion vorzugsweise in Bewegung gehalten oder durchmischt, beispielsweise durch Rühren. Es ist weiterhin

bevorzugt, dass nach Einstellen des pH-Werts die Plasmafraktion für einen bestimmten Zeitraum weiter durchmischt wird (z.B. durch Rühren), im allgemeinen für wenigstens 10 Minuten, vorzugsweise für wenigstens 20 Minuten, am bevorzugtesten für einen Zeitraum von 30 bis 90 Minuten. In diesem Zeitraum bilden sich klebrige Aggregate, die zu einem erheblichen Anteil Fibronektin erhalten. Daher ist es gemäß einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, dass ein geeigneter Rührer, z.B. ein Anker- oder Paddelrührer eingesetzt wird, an dessen Rührblatt sich der Niederschlag anheftet. Das präzipitierte Fibronektin kann somit leicht der Lösung entzogen werden.

Die pH-Fällung zur Abtrennung von Fibronektin kann in einem breiten Temperaturspektrum durchgeführt werden, z.B. von ca. 1°C bis ca. 37°C. Bevorzugte Temperaturbereiche sind 4 bis 35°C, bevorzugter 10 bis 30°C, am bevorzugtesten wird das Verfahren bei 20 bis 25°C durchgeführt.

Durch die pH-Fällung zur Abtrennung von Fibronektin aus Plasmafraktionen kann die Konzentration an Fibronektin in der Plasmafraktion um wenigstens 50% verringert werden. Vorzugsweise wird die Konzentration an Fibronektin in der Plasmafraktion um 70 bis 99%, bevorzugter um 80 bis 99%, am bevorzugtesten um 90 bis 98% oder um 95 bis 98% verringert. In einer besonderen Ausführungsform liegt der Verlust an VWF in dem Fällungsschritt bei höchstens 50%, bevorzugt bei höchstens 40%, bevorzugter bei höchstens 30%, noch bevorzugter bei höchstens 20%, am bevorzugtesten bei höchstens 10%.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine VWF enthaltende Zusammensetzung erhältlich durch ein erfindungsgemäßes Verfahren, wie es in der vorliegenden Anmeldung beschrieben ist. Vorzugsweise handelt es sich um eine im wesentlichen reine VWF-Präparation. "Im wesentlichen rein" bedeutet, dass die Zusammensetzung im wesentlichen frei von anderen Proteinen ist, insbesondere dass kein Fibronektin und kein Fibrinogen nachweisbar ist.

Die erfindungsgemäße VWF-Präparation kann eine spezifische Aktivität von wenigstens 75 E/mg Protein aufweisen, vorzugsweise hat sie eine spezifische Aktivität von wenigstens 85 E/mg Protein, bevorzugter von wenigstens 100 E/mg Protein, am bevorzugtesten von wenigstens 120 E/mg Protein. Durch das erfindungsgemäße Verfahren können somit spezifische Aktivitäten von >100 E pro mg Protein erzielt werden. Die VWF-Aktivität kann

bestimmt werden wie in den Beispielen beschrieben. Durch die erfindungsgemäße Hydroxylapatit-Chromatographie kann die spezifische Aktivität (E/mg Protein) um wenigstens 100%, bevorzugt um wenigstens 150%, am bevorzugtesten um wenigstens 175% erhöht werden.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung hat vorzugsweise eine spezifische VWF-Aktivität von wenigstens 50 E/mg VWF-Antigen, bevorzugter von wenigstens 75 E/mg VWF-Antigen, noch bevorzugter von wenigstens 100 E/mg VWF-Antigen, noch bevorzugter von wenigstens 120 E/mg VWF-Antigen, noch bevorzugter von wenigstens 125 E/mg VWF-Antigen, am bevorzugtesten von wenigstens 150 E/mg VWF-Antigen. Durch die erfindungsgemäße Hydroxylapatit-Chromatographie kann die spezifische VWF-Aktivität (E/mg VWF-Antigen) um wenigstens 20%, bevorzugt um wenigstens 35%, am bevorzugtesten um wenigstens 50% erhöht werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von Hydroxylapatit zur Herstellung eines VWF-Präparats mit hoher spezifischer VWF-Aktivität. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Hydroxylapatit zur Trennung von VWF hoher spezifischer VWF-Aktivität von VWF niedriger spezifischer VWF-Aktivität. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Hydroxylapatit zur Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer VWF enthaltenden Zusammensetzung. Die bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendung entsprechen denen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Zusammensetzung.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen VWF-Präparation, VWF-Zusammensetzung oder des VWF-Präparats zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms.

Die verschiedenen in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Ausführungsformen können miteinander kombiniert werden.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1: Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer vorgereinigten VWF-haltigen Plasmafraktion mittels Hydroxylapatit-Chromatographie im Labormaßstab

Die VWF-haltige Proteinlösung durchlief folgende Vorreinigungsstufen: Eine Kryopräzipitat-Lösung wurde einer Aluminiumhydroxid-Fällung unterzogen. Anschließend wurde eine Virusinaktivierung mittels S/D-Behandlung durchgeführt. Bei der anschließenden Anionenaustauschchromatographie fällt eine VWF-haltige Waschfraktion an, die vor allem mit Fibrinogen und Fibronectin verunreinigt ist. Die Proteinlösung wird durch Titration auf pH 5.2 einem Fällungsschritt unterzogen, bei dem ein großer Teil des Fibronectins und Fibrinogens entfernt wurde. Anschließend wurde eine Ultra- und Diafiltration durchgeführt, wobei die Proteinlösung ca. 7-fach ankonzentriert und gegen den Laufpuffer der folgenden Chromatographie diafiltriert wurde. Die so erhaltene Proteinlösung enthielt ca. 930 µg/ml VWF-Antigen, 270 µg/ml Fibrinogen-Antigen und 2400 µg/ml Fibronectin-Antigen. Die Proteinlösung wurde auf eine in 10 mM Na-Phosphat pH 7,0 equilibrierte Hydroxylapatit-Säule (CHT Typ 1, Bio-Rad, München, Deutschland) aufgetragen. Die Durchlaufraktion enthielt ca. 560 µg/ml VWF-Antigen, 5 µg/ml Fibrinogen-Antigen und 50 µg/ml Fibronectin-Antigen. Die Massenbilanz ergibt eine Schrittausbeute von 78% für VWF-Antigen und 73% VWF-Aktivität.

Eine so vorgereinigte Proteinlösung wurde zur weiteren erfindungsgemäßen Aufreinigung auf pH 6,0 titriert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Hydroxylapatit-Säule (CHT Typ 1, Bio-Rad, München, Deutschland) aufgetragen, die im Laufpuffer (20 mM Na-Phosphat pH 6,0) equilibriert worden war. Der VWF wurde quantitativ gebunden. Eine erste Elution wurde mit 45% des Elutionspuffers B (400 mM Na-Phosphat pH 6,0) durchgeführt, die zweite mit 100% B. Die aufgetragene Proteinlösung enthielt 540 µg/ml VWF-Antigen, 4 µg/ml Fibrinogen und 48 µg/ml Fibronectin. Die Aktivität des VWF in dieser Lösung betrug 46 E/ml. Die erste Elutionsfraktion enthielt 38 µg/ml VWF-Antigen, 2 µg/ml Fibronectin-Antigen und hatte eine VWF-Aktivität von 0,7 E/ml. Die Fibrinogen-Antigen-Konzentration lag unterhalb des Detektionslimits von 1 µg/ml. Die Wertfraktion (2. Elutionsfraktion) wies eine VWF-Antigen-Konzentration von 173 µg/ml, eine VWF-Aktivität von 23 E/ml auf. Weder Fibrinogen-Antigen, noch Fibronectin-Antigen konnte detektiert werden. Die Restaktivität von Faktor VIII lag ebenfalls unterhalb des Detektionslimits. Die spezifischen VWF-Aktivitäten konnten von 85 E / mg VWF-Antigen auf 133 E / mg VWF-Antigen gesteigert werden. Der spezifische VWF-Aktivitätswert der ersten Elutionsfraktion von 18 E / mg VWF-Antigen,

belegt, dass speziell wenig aktive VWF-Moleküle abgetrennt werden. Die Ausbeute an VWF-Aktivität liegt bei 84%, die an VWF-Antigen bei 51%.

Tabelle 2: Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer vorgereinigten VWF-haltigen Plasmafraktion mittels Hydroxylapatit-Chromatographie im Labormaßstab

	VWF-Antigen [µg/ml]	VWF-Aktivität [E/ml]	Spezifische VWF-Aktivität [E pro mg VWF-Antigen]
Ausgangsmaterial aus Chrom. I	560	46	85
Elution 1 Chrom. II	38	0,7	18
Elution 2 Chrom. II	173	23	133

Die Konzentration an VWF-Antigen wurde mit Hilfe des STA[®] Compact der Firma Diagnostica Stago (Roche Diagnostics, Mannheim) und deren Test-Reagenzien (STA LIA vWF) bestimmt.

Die VWF-Aktivität wurde als Ristocetin-Cofaktor-Aktivität über Plättchenagglutination mit dem BCT[®]-Analyser (Behring Coagulation Timer, Dade Behring, Schwalbach) bestimmt. Der Ristocetin-Cofaktor-Assay ermittelt die Bindungsfähigkeit von VWF an den Plättchenrezeptor Glycoprotein Ib/IX unter dem Einfluss des Antibiotikums Ristocetin.

Beispiel 2: Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer vorgereinigten VWF-haltigen Plasmafraktion mittels Hydroxylapatit-Chromatographie im Technikumsmaßstab

Die Ausgangslösung wurde entsprechend Beispiel 1 bis zur ersten Chromatographie präpariert. Die so erhaltene Proteinlösung enthielt ca. 1,43 mg/ml VWF-Antigen bei einer Proteingesamtkonzentration von 3,79 mg/ml. Die Spezifische Aktivität betrug 36,4 E / mg Protein. Für die chromatographische Reinigung wurden Säulen mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet. Die Proteinlösung wurde in einem ersten chromatographischen Reinigungsschritt auf eine in 10 mM Na-Phosphat pH 7,0 equilibrierte Hydroxylapatit-Säule (CHT Typ 1, Bio-Rad, München, Deutschland) mit 1,0 l Gelbettvolumen aufgetragen. Die Durchlaufraktion (Wertfraktion 1) enthielt ca. 0,67 mg/ml VWF-Antigen bei einer Proteingesamtkonzentration von 0,86 mg/ml. Die Spezifische Aktivität betrug 68,7 E / mg Protein und die Spezifische VWF-Aktivität 96,5 E / mg VWF-Antigen.

Eine so vorgereinigte Proteinlösung wurde zur weiteren Aufreinigung und zur Abtrennung von wenig aktiven VWF-Molekülen auf pH 6,5 titriert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Hydroxylapatit-Säule (CHT Typ 2, Bio-Rad, München, Deutschland) mit einem Gelbettvolumen von 1,5 l aufgetragen, die im Laufpuffer (20 mM Na-Phosphat pH 6,5) equilibriert worden war. Der VWF wurde quantitativ gebunden. Eine erste Elution zur Abtrennung von wenig aktiven VWF-Molekülen wurde mit 220 mM Na-Phosphat pH 6,5 durchgeführt. Die Wertfraktion 2 mit einer Proteinkonzentration von 0,20 mg/ml und einem Gehalt an VWF-Antigen von 0,13 mg/ml wurde im Anschluss mit 300 mM Na-Phosphat pH 6,5 eluiert. Durch diesen chromatographischen Schritt konnte die spezifische VWF-Aktivität von 87,5 E / mg VWF-Antigen auf 171 E / mg VWF-Antigen erhöht werden. Die spezifische Aktivität wurde dabei auf 107 E / mg Protein gesteigert. Verunreinigungen wie Fibronektin, Fibrinogen oder Faktor VIII lagen unterhalb des Detektionslimits.

Die Veränderung der Spezifischen VWF-Aktivitäten während des Reinigungsprozesses (siehe Tabelle 3) zeigt, dass während der ersten Chromatographie dieser Parameter nicht positiv beeinflusst wird. Der erfindungsgemäße zweite Chromatographische Schritt ist dagegen hervorragend geeignet, die Spezifische VWF-Aktivität zu steigern, was einer Abtrennung von wenig aktiven VWF-Molekülen entspricht.

Tabelle 3: Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer vorgereinigten VWF-haltigen Plasmafraktion mittels Hydroxylapatit-Chromatographie im Technikumsmaßstab

	VWF-Antigen [mg/ml]	Spezifische Aktivität [E pro mg Protein]	Spezifische VWF-Aktivität [E pro mg VWF- Antigen]
Ausgang	1,43	36,4	96,5
Wertfraktion 1	0,67	68,7	87,5
Wertfraktion 2	0,13	107	171

VWF-Antigen und VWF-Aktivität wurden bestimmt wie in Beispiel 1 angegeben.

Die Proteinbestimmung wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$) durchgeführt, wobei

A =Absorption bei 280 nm

ϵ =Absorptionskoeffizient (hier theoretischer Absorptionskoeffizient $0,75 \text{ cm}^2/\text{mg}$)

c =Proteinkonzentration in mg/ml

d =Schichtdicke in cm.

Beispiel 3: Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer vorgereinigten VWF-haltigen Plasmafraktion mittels Fluoroapatit-Chromatographie

Die Ausgangslösung wurde entsprechend Beispiel 1 bis zur zweiten Chromatographie präpariert. Die Proteinlösung enthielt bei einer Proteinkonzentration von $0,83 \text{ mg/ml}$ eine spezifische Aktivität von $64,8 \text{ E/mg}$ und eine spezifische VWF-Aktivität von $95,1 \text{ mg/ml}$.

Durch Zugabe von HCl wurde die Proteinlösung auf einen pH-Wert von 6,0 titriert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Fluoroapatit-Säule (CFT Typ 1, Bio-Rad, München, Deutschland) mit einem Gelbettvolumen von $13,2 \text{ ml}$ aufgetragen, die im Laufpuffer ($20 \text{ mM Na-Phosphat pH } 6,0$) equilibriert worden war. Ein Teil des VWF wurde gebunden. Eine Abtrennung von wenig aktiven VWF-Molekülen wurde durch eine erste Elution mit einem Puffer erzielt, der $241 \text{ mM Na-Phosphat pH } 6,0$ enthielt (Wertfraktion 1). Die Wertfraktion 2 mit einer Proteinkonzentration von $0,12 \text{ mg/ml}$ und einem Gehalt an VWF-Antigen von $0,06 \text{ mg/ml}$ wurde im Anschluss mit $400 \text{ mM Na-Phosphat pH } 6,0$ eluiert. Durch diesen chromatographischen Schritt konnte die spezifische VWF-Aktivität auf $152 \text{ E / mg VWF-Antigen}$ erhöht werden. Die spezifische Aktivität wurde dabei auf $77 \text{ E / mg Protein}$ gesteigert. Aufgrund der schwächeren Bindung von VWF bei den gewählten pH-Bedingungen findet keine komplette Bindung des VWF statt, so dass sich ein Teil in der Durchlaufraction befindet.

Tabelle 4: Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer vorgereinigten VWF-haltigen Plasmafraktion mittels Fluoroapatit-Chromatographie

	VWF-Antigen [mg/ml]	Spezifische Aktivität [E pro mg Protein]	Spezifische VWF-Aktivität [E pro mg VWF- Antigen]
Ausgang	0,57	64,8	95,1
Durchlauf	0,07	47,1	89
Wertfraktion 1	0,06	39,3	71,7
Wertfraktion 2	0,06	77	152

Ergänzende Literaturstellen

Folgende Literaturstellen zu verschiedenen Analytikmethoden werden ergänzend genannt:

VWF-Aktivität:

Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D (1998): Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Lab Res* 28 (4): 201-210.

VWF-Antigen:

Budde U, et al. (1984): Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood* 64 (5): 981-985.

Newman DJ, Henneberry H, Price CP (1992): Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann Clin Biochem* 29 (Pt1): 22-42.

Fibronectin-Antigen:

Sandberg L, et al. (1985): Plasma fibronectin levels in acute and recovering malnourished children. *Clin Physiol Biochem.* 3(5):257-264.

Colli A, et al. (1986): Diagnostic accuracy of fibronectin in the differential diagnosis of ascites. *Cancer.*: 58(11):2489-2493.

Fibrinogen-Antigen:

Ernst E, Resch KL (1993): Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med.*: 118(12):956-963.

Jelic-Ivanovic Z, Pevcevic N (1990): Fibrinogen determination by five methods in patients receiving streptokinase therapy. *Clin Chem.*: 36(4):698-699.

Ansprüche:

1. Verfahren zur Trennung von VWF mit hoher Aktivität von VWF mit niedriger Aktivität, umfassend eine Chromatographie mit Hydroxylapatit als Chromatographie-Matrix.
2. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung mit hoher spezifischer VWF-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, dass man eine VWF enthaltende Zusammensetzung durch Hydroxylapatit-Chromatographie aufreinigt.
3. Verfahren zur Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer VWF enthaltenden Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass man die VWF enthaltende Zusammensetzung einer Hydroxylapatit-Chromatographie unterwirft.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass VWF an die Hydroxylapatit-Säulenmatrix gebunden wird, VWF mit niedriger spezifischer Aktivität herausgewaschen wird und anschließend VWF mit hoher spezifischer Aktivität bei höherer Salzkonzentration eluiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Chromatographie bei einem pH-Wert zwischen 5 und 7, vorzugsweise zwischen 5,5 und 6,8 durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Laufpuffer eine Natrium- bzw. Kaliumphosphat-haltige Lösung verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Waschpuffer 100-300 mM, vorzugsweise 200-300 mM, und der Elutionspuffer 200-500 mM, vorzugsweise 300-400 mM Natrium- oder Kaliumphosphat enthält.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zunächst eine Durchlaufchromatographie mit Hydroxylapatit durchgeführt wird, die

Durchlaufraktion unter bindenden Bedingungen rechromatographiert und das Zielprotein als hochreine VWF-Fraktion eluiert wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man keramisches Hydroxylapatit verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das keramische Hydroxylapatit vom Typ I bzw. Typ II ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangsmaterial eine vorgereinigte Plasmafraktion verwendet wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangsmaterial eine weiter aufgereinigte Kryopräzipitat-Lösung verwendet wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangsmaterial eine mit Aluminiumhydroxid gefällte Kryopräzipitat-Lösung verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangsmaterial eine chromatographisch vorgereinigte Aluminiumhydroxid-gefällte Kryopräzipitat-Lösung verwendet wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass vor der Hydroxylapatit-Chromatographie eine pH-Fällung zur Abtrennung von Fibronectin durchgeführt wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangsmaterial eine Proteinlösung mit rekombinant hergestelltem VWF verwendet wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das verwendete Hydroxylapatit Fluoridionen enthält.

18. Verwendung von Hydroxylapatit zur Trennung von VWF-Molekülen hoher Aktivität von VWF-Molekülen niedriger Aktivität.

19. Verwendung von Hydroxylapatit zur Herstellung eines VWF-Präparats mit hoher spezifischer VWF-Aktivität.
20. Verwendung von Hydroxylapatit zur Erhöhung der spezifischen VWF-Aktivität einer VWF enthaltenden Zusammensetzung.
21. VWF enthaltende Zusammensetzung erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16.
22. VWF enthaltende Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine spezifische Aktivität von wenigstens 120 E/mg Protein aufweist.
23. Zusammensetzung nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie weiterhin eine spezifische VWF-Aktivität von wenigstens 120 E/mg VWF-Antigen aufweist.
24. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 21 bis 23 zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/009729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/745

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, FSTA, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEDERICI AUGUSTO B: "The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues." HAEMATOLOGICA. JUN 2003, vol. 88, no. 6, June 2003 (2003-06), page EREPO2, XP002356462 ISSN: 1592-8721 page 8, left-hand column, paragraph 2 - page 9, right-hand column, paragraph 1; table 4	22,23
A	page 8, left-hand column, paragraph 2 - page 9, right-hand column, paragraph 1	1-21
X	US 5 128 245 A (GREENBERG ET AL) 7 July 1992 (1992-07-07)	21
A	column 6, line 45 - line 60 example 10	1
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 2005

Date of mailing of the international search report

23/12/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/009729

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GORMAN J J ET AL: "STUDIES ON THE STRUCTURE AND SUBUNIT COMPOSITION OF HUMAN ANTI HEMOPHILIC FACTOR" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 12, no. 2, 1978, pages 341-352, XP002356463 ISSN: 0049-3848 page 341 - page 345, paragraph VORLETZTER; figures 1,2; table 1</p>	1-21
X	<p>SAUNDRY R H ET AL: "CHROMATOGRAPHY OF VWF ON DEXTRAN SULFATE SEPHAROSE" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 48, no. 6, 1987, pages 641-652, XP002356464 ISSN: 0049-3848 the whole document</p>	22,23
A	<p>abstract page 642, paragraph 5 - page 643, paragraph 2; figure 1</p>	1-20
A	<p>JANSON JC, RYDEN L (EDTS): "Protein purification-principles, high-resolution methods and applications" 1998, WILEY-LISS, NEW YORK, XP002356473 page 190, paragraph 6 - page 191, paragraph 6 page 199; figure 4.14 page 200, paragraph 1 - paragraph 2</p>	1-20
A	<p>BERNARDI G: "Chromatography of proteins on hydroxyapatite" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 27, 1973, pages 471-479, XP009057844 page 471 - page 479</p>	1-21
X	<p>BARINGTON K A ET AL: "A VERY-HIGH-PURITY VON WILLEBRAND FACTOR PREPARATION CONTAINING HIGH-MOLECULAR-WEIGHT MULTIMERS" VOX SANGUINIS, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol. 76, March 1999 (1999-03), pages 85-89, XP000971400 ISSN: 0042-9007 abstract page 85, paragraph 2 page 85, right-hand column, paragraph 3 - page 87, left-hand column; table 2</p>	21,24
A	<p>----- -/--</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/009729

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LETHAGEN S ET AL: "A COMPARITIVE IN VITRO EVALUATION OF SIX VON WILLEBRAND FACTOR CONCENTRATES" HAEMOPHILIA, BLACKWELL SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 10, no. 3, May 2004 (2004-05), pages 243-249, XP001182495 ISSN: 1351-8216. the whole document</p>	21-24
X	<p>BURNOUF-RADOSEVICH M ET AL: "CHROMATOGRAPHIC PREPARATION OF A THERAPEUTIC HIGHLY PURIFIED VON WILLEBRAND FACTOR CONCENTRATE FROM HUMAN CRYOPRECIPITATE" VOX SANGUINIS, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol. 62, no. 1, 1992, pages 1-11, XP009045809 ISSN: 0042-9007, the whole document</p>	21-24
A		1-20
A	<p>VEYRADIER A ET AL: "Laboratory diagnosis of von Willebrand disease" INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY RESEARCH, vol. 28, no. 4, December 1998 (1998-12), pages 201-210, XP009058399 ISSN: 0940-5437 page 203, right-hand column, paragraph 3; table 2 page 208, right-hand column, last paragraph - page 209, left-hand column, paragraph 1</p>	1-24

Information on patent family members

PCT/EP2005/009729

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
C07K14/745

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, FSTA, CHEM ABS Data, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FEDERICI AUGUSTO B: "The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues." HAEMATOLOGICA. JUN 2003, Bd. 88, Nr. 6, Juni 2003 (2003-06), Seite EREP02, XP002356462 ISSN: 1592-8721 Seite 8, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 9, rechte Spalte, Absatz 1; Tabelle 4	22,23
A	Seite 8, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 9, rechte Spalte, Absatz 1	1-21
X	US 5 128 245 A (GREENBERG ET AL) 7. Juli 1992 (1992-07-07)	21
A	Spalte 6, Zeile 45 - Zeile 60 Beispiel 10	1
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Dezember 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/12/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Strobel, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	GORMAN J J ET AL: "STUDIES ON THE STRUCTURE AND SUBUNIT COMPOSITION OF HUMAN ANTI HEMOPHILIC FACTOR" THROMBOSIS RESEARCH, Bd. 12, Nr. 2, 1978, Seiten 341-352, XP002356463 ISSN: 0049-3848 Seite 341 - Seite 345, Absatz VORLETZTER; Abbildungen 1,2; Tabelle 1	1-21
X	SAUNDRY R H ET AL: "CHROMATOGRAPHY OF VWF ON DEXTRAN SULFATE SEPHAROSE" THROMBOSIS RESEARCH, Bd. 48, Nr. 6, 1987, Seiten 641-652, XP002356464 ISSN: 0049-3848 das ganze Dokument	22,23
A	Zusammenfassung Seite 642, Absatz 5 - Seite 643, Absatz 2; Abbildung 1	1-20
A	JANSON JC, RYDEN L (EDTS): "Protein purification-principles, high-resolution methods and applications" 1998, WILEY-LISS, NEW YORK, XP002356473 Seite 190, Absatz 6 - Seite 191, Absatz 6 Seite 199; Abbildung 4.14 Seite 200, Absatz 1 - Absatz 2	1-20
A	BERNARDI G: "Chromatography of proteins on hydroxyapatite" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 27, 1973, Seiten 471-479, XP009057844 Seite 471 - Seite 479	1-21
X	BARINGTON K A ET AL: "A VERY-HIGH-PURITY VON WILLEBRAND FACTOR PREPARATION CONTAINING HIGH-MOLECULAR-WEIGHT MULTIMERS" VOX SANGUINIS, S. KARGER AG, BASEL, CH, Bd. 76, März 1999 (1999-03), Seiten 85-89, XP000971400 ISSN: 0042-9007 Zusammenfassung	21,24
A	Seite 85, Absatz 2 Seite 85, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 87, linke Spalte; Tabelle 2	1-20
-/--		

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LETHAGEN S ET AL: "A COMPARITIVE IN VITRO EVALUATION OF SIX VON WILLEBRAND FACTOR CONCENTRATES" HAEMOPHILIA, BLACKWELL SCIENCE, OXFORD, GB, Bd. 10, Nr. 3, Mai 2004 (2004-05), Seiten 243-249, XP001182495 ISSN: 1351-8216 das ganze Dokument	21-24
X	BURNOUF-RADOSEVICH M ET AL: "CHROMATOGRAPHIC PREPARATION OF A THERAPEUTIC HIGHLY PURIFIED VON WILLEBRAND FACTOR CONCENTRATE FROM HUMAN CRYOPRECIPITATE" VOX SANGUINIS, S. KARGER AG, BASEL, CH, Bd. 62, Nr. 1, 1992, Seiten 1-11, XP009045809 ISSN: 0042-9007 das ganze Dokument	21-24
A		1-20
A	VEYRADIER A ET AL: "Laboratory diagnosis of von Willebrand disease" INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY RESEARCH, Bd. 28, Nr. 4, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 201-210, XP009058399 ISSN: 0940-5437 Seite 203, rechte Spalte, Absatz 3; Tabelle 2 Seite 208, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 209, linke Spalte, Absatz 1	1-24

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument

Datum der
Veröffentlichung

**Mitglied(er) der
Patentfamilie**

**Datum der
Veröffentlichung**

US 5128245

A

07-07-1992

All

4198589 A

23-03-1990

CA

1332050 C

20-09-1994

WO

9002197 A1

08-03-1990